

## ESCOAMENTO EM MICROCANAIS DE FLUIDOS ANÁLOGOS AO SANGUE BASEADOS EM VESÍCULAS UNILAMELARES GIGANTES

**Denise A. M. Carvalho<sup>1</sup>, Ana Rita O. Rodrigues<sup>2</sup>, Vera Faustino<sup>3</sup>, Diana Pinho<sup>4</sup>, Rui A. Lima<sup>1,5</sup> e Elisabete M. S. Castanheira<sup>2</sup>**

<sup>1</sup> ESTiG, Instituto Politécnico de Bragança, Campus de Sta. Apolónia, 5301-857 Bragança, Portugal; [denisemotacarvalho@gmail.com](mailto:denisemotacarvalho@gmail.com)

<sup>2</sup> Centro de Física da Universidade do Minho (CFUM), Campus de Gualtar, 4710-057 Braga, Portugal; [ritarodrigues@fisica.uminho.pt](mailto:ritarodrigues@fisica.uminho.pt); [ecoutinho@fisica.uminho.pt](mailto:ecoutinho@fisica.uminho.pt)

<sup>3</sup> MEMS-UMinho Research Unit, DEI, Universidade do Minho, Campus de Azurém, 4800-058 Guimarães, Portugal; CEFT, Faculdade de Engenharia da Universidade do Porto, Rua Dr. Roberto Frias, 4200-465 Porto, Portugal; [verafaustino@ipb.pt](mailto:verafaustino@ipb.pt)

<sup>4</sup> ESTiG, Instituto Politécnico de Bragança, Campus de Sta. Apolónia, 5301-857 Bragança, Portugal; CEFT, Faculdade de Engenharia da Universidade do Porto, Rua Dr. Roberto Frias, 4200-465 Porto, Portugal; [diana@ipb.pt](mailto:diana@ipb.pt)

<sup>5</sup> MEtRICS, Departamento de Engenharia Mecânica, Universidade do Minho, Campus de Azurém, 4800-058 Guimarães, Portugal; CEFT, Faculdade de Engenharia da Universidade do Porto, Rua Dr. Roberto Frias, 4200-465 Porto, Portugal; [rl@dem.uminho.pt](mailto:rl@dem.uminho.pt)

**PALAVRAS CHAVE:** Análogos ao sangue, vesículas unilamelares gigantes, microfluídica, deformação de células, hemoreologia.

**RESUMO:** *Um dos maiores desafios em análogos ao sangue é a incorporação de componentes do tipo celular capazes de desempenhar funções fundamentais, tais como o transporte de gases e nutrientes, e a capacidade para se deformarem quando estes passam através de capilares. Neste trabalho, procedeu-se ao desenvolvimento de um análogo ao sangue inovador baseado em Vesículas Unilamelares Gigantes (GUVs), para reproduzir o escoamento dos glóbulos vermelhos (GVs). Nos ensaios experimentais de escoamento verificou-se que os GUVs demonstraram, não só a capacidade de se deformarem, mas também possuírem diâmetros muito próximos dos GVs. Adicionalmente, as amostras com GUVs em suspensão demonstraram também possuir um comportamento reológico idêntico a amostras contendo 5% de GVs humanos em soro fisiológico.*

### 1 INTRODUÇÃO

O desenvolvimento de fluidos análogos ao sangue continua a atrair a atenção de investigadores por todo o mundo, a fim de mimetizar as características físicas e reológicas do sangue real [1 – 4]. Vários fluidos análogos ao sangue têm sido desenvolvidos, apresentando comportamentos reológicos idênticos ao do sangue [1, 2]. Contudo, estes fluidos não possuem, na sua composição elementos celulares, como é o caso dos GVs do sangue, que realizam funções indispensáveis à vida, como o transporte de gases e nutrientes por todo o corpo, e que têm a capacidade de se deformarem, mesmo quando escoam em microvasos menores do que os GVs, como é o caso dos capilares.

Assim, não se pode pensar apenas no desenvolvimento de um fluido como um todo; também é necessário focalizar a nossa atenção nos elementos celulares presentes no sangue humano e tentar recriá-los experimentalmente.

Trabalhos experimentais realizados anteriormente [3, 5] estudaram vários fluidos análogos ao sangue contendo partículas de poliestireno e polimetilmetacrilato, com o objetivo de recriar o escoamento dos GVs. No entanto, estas partículas apresentam uma grande desvantagem, que é o facto de serem rígidas e, em escoamento, não se deformarem da mesma forma que os GVs. Para se ultrapassar esta desvantagem, optou-se por

tentar preparar laboratorialmente formulações que tivessem um comportamento mais próximo dos GVs.

Com o intuito de atingir este objetivo, neste trabalho foi desenvolvido um fluido inovador análogo ao sangue contendo Vesículas Unilamelares Gigantes (GUVs) [6, 7], para simular o escoamento dos GVs em microcanais.

Os GUVs foram preparados por hidratação de um filme lipídico, seguida de extrusão através de membranas de policarbonato com 8  $\mu\text{m}$  de diâmetro.

Assim, com este estudo pretende-se, não só verificar a capacidade dos GUVs para se deformarem, mas também averiguar, em termos de diâmetro, se estes se aproximam dos GVs. Adicionalmente, pretende-se também analisar o seu comportamento reológico, comparando-o com o de amostras contendo 5% de GVs humanos em soro fisiológico.

## 2 MATERIAIS E MÉTODOS

### 2.1 PREPARAÇÃO DOS GUVS

As soluções de GUVs foram preparadas usando uma mistura natural de lípidos, lecitina de soja (Stern, USA), pelo método de hidratação de filme lipídico. Após a obtenção do filme, adicionaram-se 8 ml de solução-tampão TRIS-HCl de  $\text{pH}=7,4$  em água ultrapura. As dispersões assim obtidas foram levadas a um banho de ultrassons (Branson 320) durante 1 a 2 minutos, até se obter uma solução homogênea. Em seguida, realizou-se a extrusão (num Extrusor LIPEX<sup>TM</sup>, Northern Lipids), usando membranas de policarbonato com poros de 8  $\mu\text{m}$  de diâmetro, a uma pressão de 1,5 bar. Para finalizar, adicionou-se às soluções o corante Vermelho de Nilo (*Nile Red*) numa concentração de  $2 \times 10^{-3}$  M, com o objetivo de melhorar a visualização dos GUVs por microscopia.

### 2.2 DIMENSÕES DO MICROCANAL E VISUALIZAÇÕES DO ESCOAMENTO

As visualizações dos escoamentos e a análise do comportamento dos GUVs foram realizadas

através de um microcanal em PDMS com uma contração hiperbólica (Fig.1).

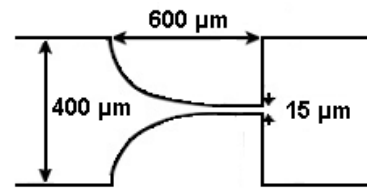


Fig. 1 Geometria e dimensões do microcanal.

De forma a realizar-se a observação e captação dos vídeos dos escoamentos, foi utilizado um microscópio invertido (IX71, Olympus) e uma câmara de alta velocidade (FastCAM SA3, Photron). Os vídeos obtidos foram analisados recorrendo ao *software* de análise de imagem *ImageJ*, sendo assim possível medir o índice de deformação,  $ID = (X - Y) / (X + Y)$ , dos GUVs, tendo-se seguido a estratégia usada por Faustino *et al.* [8].

### 2.3 CARACTERIZAÇÃO REOLÓGICA

As curvas de viscosidade das soluções contendo GUVs foram obtidas através de um reómetro de tensão controlada (Bohlin CVO, Malvern), utilizando uma geometria cone-prato de 50 mm de diâmetro. Os testes foram realizados à temperatura de  $22 \pm 1^\circ\text{C}$ , correspondendo à temperatura ambiente verificada durante a realização do escoamento.

## 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Por intermédio das visualizações dos escoamentos nos microcanais com contração hiperbólica, observou-se que os GUVs na região 4 e com um caudal de 10  $\mu\text{l}/\text{min}$ , apresentaram um ID de 0,69 (Fig. 2), sendo que GVs humanos em condições de escoamento equivalentes apresentam um índice de deformação de 0,61 [8].

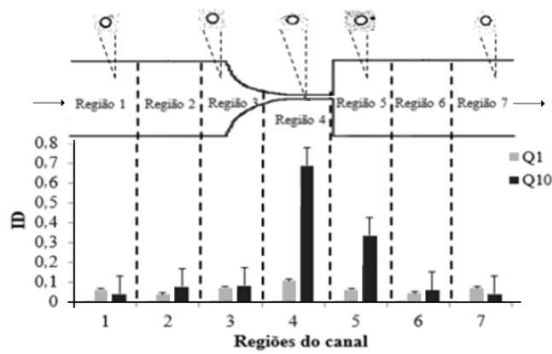


Fig. 2 Índice de deformação (ID) dos GUVs ao longo do microcanal hiperbólico para a solução C1 (solução de GUVs com uma concentração de  $1 \times 10^{-3}$  M) e nos dois caudais estudados Q1 e Q10 (1 e 10  $\mu\text{l}/\text{min}$ , respetivamente).

Relativamente ao diâmetro dos GUVs, verificou-se que, em todas as soluções, os tamanhos mais frequentes corresponderam a valores entre 5 a 7  $\mu\text{m}$ , ou seja, valores próximos em termos de tamanhos dos GVs, que apresentam cerca de 7 a 8  $\mu\text{m}$  de diâmetro [9] (Fig. 3).

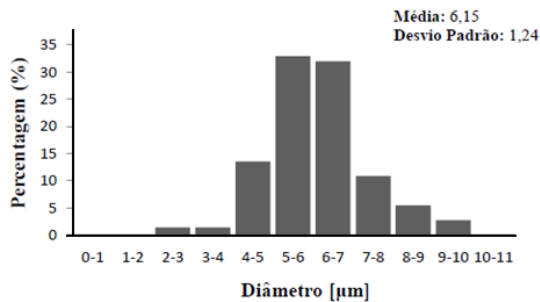


Fig. 3 Diâmetro dos GUVs para a solução C1 (solução de GUVs com uma concentração de  $1 \times 10^{-3}$  M).

Por intermédio de um reómetro, foi analisado o comportamento reológico de duas amostras. Na Fig. 4 é possível observar a curva de viscosidade de uma amostra com 5% de GVs humanos em soro fisiológico, a diferentes taxas de deformação. Estes resultados apresentam inicialmente um suave declive na curva de viscosidade, ou seja, uma ligeira descida da viscosidade com o aumento da taxa de deformação. No entanto, para taxas de deformação mais elevadas torna-se evidente que este fluido tem um comportamento Newtoniano. Relativamente à amostra com a suspensão de GUVs, esta apresenta também um comportamento Newtoniano para taxas de deformação mais elevadas.

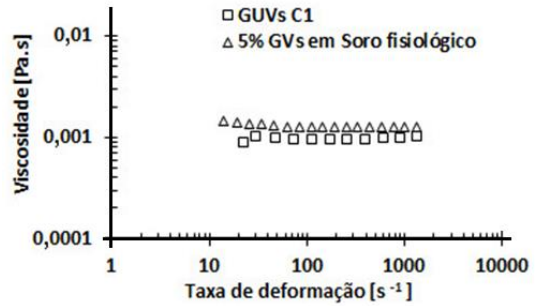


Fig. 4 Viscosidade da solução de GUVs C1 e de 5% de GV em soro fisiológico.

## 4 CONCLUSÕES

Neste trabalho, foram desenvolvidas soluções contendo GUVs com uma concentração de  $1 \times 10^{-3}$  M. Recorrendo às visualizações dos escoamentos dos GUVs, pode concluir-se que os mesmos têm um comportamento idêntico aos GVs humanos, apresentando uma elevada capacidade de deformação aquando da passagem por uma contração de dimensão reduzida. Em termos de diâmetros, pode verificar-se que os GUVs apresentam valores entre os 5 a 7  $\mu\text{m}$ , valores estes próximos dos apresentados pelos GVs humanos.

Verificou-se também uma boa concordância entre o fluido análogo ao sangue desenvolvido e uma amostra contendo 5% de GVs humanos em soro fisiológico. Estes resultados indicam que a introdução destas vesículas em fluidos análogos ao sangue poderá possibilitar uma melhor mimetização do sangue real.

## AGRADECIMENTOS

Este trabalho foi suportado pela Fundação Portuguesa para a Ciência e a Tecnologia (FCT) no âmbito do financiamento estratégico UID/FIS/04650/2013. Os autores também agradecem o financiamento da FCT através do projeto PTDC/QEQ-FTT/4287/2014 e BD SFRH/BD/89077/2012 e à Professora Olga Ferreira, Instituto Politécnico de Bragança, pela ajuda prestada no desenvolvimento deste trabalho.

## REFERÊNCIAS

- [1] P. C. Sousa, F. T. Pinho, M. S. N. Oliveira, and M. A. Alves, "Extensional flow of blood analog solutions in microfluidic devices," *Biomicrofluidics*, vol. 5, no. 1, pp. 1–19, 2011.
- [2] L. Campo-Deaño, R. P. A. Dullens, D. G. A. L. Aarts, F. T. Pinho, and M. S. N. Oliveira, "Viscoelasticity of blood and viscoelastic blood analogues for use in polydimethylsiloxane in vitro models of the circulatory system," *Biomicrofluidics*,

vol. 7, p. 34102, 2013.

[3] J. Calejo, D. Pinho, F. J. Galindo-Rosales, R. Lima, and L. Campo-Deaño, "Particulate blood analogues reproducing the erythrocytes cell-free layer in a microfluidic device containing a hyperbolic contraction," *Micromachines*, vol. 7, no. 1, pp. 1–12, 2016.

[4] B. Muñoz-Sánchez, S. Silva, D. Pinho, E. Vega, and R. Lima, "Generation of micro-sized PDMS particles by a flow focusing technique for biomicrofluidics applications," *Biomicrofluidics*, vol. 10, no. 1, p. 14122, 2016.

[5] J. A. C. Calejo, "Desenvolvimento de Fluidos Bifásicos Análogos ao Sangue: Estudo Reológico, Escoamento em Microcanais e Simulações Numéricas," Instituto Politécnico de Bragança, 2013.

[6] A. L. F. Baptista, P. J. G. Coutinho, M. E. C. D. R. Oliveira, and J. I. N. R. Gomes, "Effect of Surfactants in Soybean Lecithin Liposomes Studied by Energy Transfer Between NBD-PE and N-Rh-PE," *J. Liposome Res.*, vol. 10, no. 4, pp. 419–429, 2000.

[7] Y. Tamba, H. Terashima, and M. Yamazaki, "A membrane filtering method for the purification of giant unilamellar vesicles," *Chem. Phys. Lipids*, vol. 164, no. 5, pp. 351–358, 2011.

[8] V. Faustino, D. Pinho, T. Yaginuma, R. C. Calhela, I. C. F. R. Ferreira, and R. Lima, "Extensional flow-based microfluidic device: Deformability assessment of red blood cells in contact with tumor cells," *Biochip J.*, vol. 8, no. 1, pp. 42–47, 2014.

[9] R. Lima, T. Ishikawa, Y. Imai, and T. Yamaguchi, "Blood flow behaviour in microchannels: past, current and future trends," in *Single and 2-phase flows on chemical and biomedical engineering*, 2012, pp. 513–547.